

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2801398号

(45) 発行日 平成10年(1998) 9月21日

(24) 登録日 平成10年(1998) 7月10日

(51) Int.Cl.⁹

識別記号

F I

C 1 1 D 3/386
3/395

C 1 1 D 3/386
3/395

請求項の数21(全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平2-513890

(86) (22) 出願日 平成2年(1990)10月12日

(65) 公表番号 特表平5-503542

(43) 公表日 平成5年(1993)6月10日

(86) 国際出願番号 P C T / D K 9 0 / 0 0 2 6 1

(87) 国際公開番号 W O 9 1 / 0 5 8 3 9

(87) 国際公開日 平成3年(1991)5月2日

審査請求日 平成7年(1995)8月29日

(31) 優先権主張番号 4 2 1, 4 1 4

(32) 優先日 1989年10月13日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(73) 特許権者 999999999

ノボ ノルディスク アクティーゼルス
カブ

デンマーク国, デーヨー-2880 バグス
パエルト, ノボ アレ (番地なし)

(73) 特許権者 999999999

ザ プロクター アンド ギャンブル
カンパニー

アメリカ合衆国, オハイオ 45202, シ
ンシナティ, プロクター アンド ギャ
ンブル プラザ 1

(74) 代理人 弁理士 青木 朗 (外3名)

審査官 藤原 浩子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 染料移行防止

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 洗液中で布帛と一緒に洗濯および／またはすすぐ場合に染色した布帛から他の布帛への繊維染料の移行を防止する方法であって、

1) a) 前記布帛を洗濯しおよび／またはすすぐ洗液にペルオキシダーゼ活性を示す酵素を加え、さらに
b) 洗濯および／またはすすぐ過程の最初またはその間に過酸化水素、過酸化水素前駆体または過酸化水素を発生しうる酵素系を前記a) の洗液に加えるか、あるいは
2) 前記洗液にフェノール系化合物に対してオキシダーゼ活性を示す酵素を加える
ことを特徴とする方法。

【請求項2】 ペルオキシダーゼがコプリナス (Coprinus) またはパチルス・プミルス (B. pumilus) の菌株由来するものである請求の範囲第1項に記載の方法。

【請求項3】 過酸化水素前駆体が過ホウ酸塩または過炭酸塩である請求の範囲第1項または第2項に記載の方法。

【請求項4】 オキシダーゼ活性を示す酵素がカタコールオキシダーゼ (EC 1.10.3.1) またはラッカーゼ (EC 1.10.3.2) である請求の範囲第1項に記載の方法。

【請求項5】 繊維染料が合成染料、または天然もしくは天然同一性染料である請求の範囲第1項～第4項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 金属イオン、ハライドイオンおよびフェノール系化合物から成る群から選択される追加の酸化性基質を洗濯および／またはすすぐ過程の最初またはその間に洗液に添加する請求の範囲第1項～第5項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 洗液に添加される前記酸化性基質の量が1

μM ～ 1mM の間である請求の範囲第6項に記載の方法。

【請求項8】酵素が微生物により産生されるものである請求の範囲第1項～第7項のいずれか1に記載の方法。

【請求項9】酵素が植物起源である請求の範囲第1項～第8項のいずれか1に記載の方法。

【請求項10】酵素が、該酵素をコードするDNA配列ならびに該酵素の発現を許す機能をコードするDNA配列を有する組換え体DNAベクターで形質転換された宿主細胞を酵素の発現を許す条件下で培養基中にて培養し次いで培養物から酵素を回収することからなる方法により産生されるものである請求の範囲第1項～第9項のいずれか1に記載の方法。

【請求項11】ペルオキシダーゼ活性を示す酵素がハロペルオキシダーゼである請求の範囲第1項、第3項および第5項～第10項のいずれか1に記載の方法。

【請求項12】酵素が $\text{pH}6.5\sim 10.5$ にて活性である請求の範囲第1項～第11項のいずれか1に記載の方法。

【請求項13】酵素が $0.01\sim 100\text{mg}/()$ 洗液の量で添加される請求の範囲第1項～第12項のいずれか1に記載の方法。

【請求項14】酵素が洗剤組成物中に混入される請求の範囲第1項～第13項のいずれか1に記載の方法。

【請求項15】洗液または分散液中の繊維染料を漂白する方法であって、該溶液または分散液に、フェノール性化合物に対してオキシダーゼ活性を示す化合物、並びに金属イオン、ハライドイオンおよびフェノール系化合物から成る群から選択される追加の酸化性基質を添加することを特徴とする方法。

【請求項16】オキシダーゼ活性を示す酵素がカテコールオキシダーゼ (EC 1.10.3.1) またはラッカーゼ (EC 1.10.3.2) である請求の範囲第15項に記載の方法。

【請求項17】酵素が $\text{pH}6.5\sim 10.5$ にて活性である請求の範囲第15項または第16項に記載の方法。

【請求項18】繊維染料が合成染料、または天然もしくは天然同一性染料である請求の範囲第15項～第17項のいずれか1に記載の方法。

【請求項19】添加される酸化性基質の量が $1\mu\text{M}\sim 1\text{mM}$ の間である請求の範囲第18項に記載の方法。

【請求項20】無粉塵性顆粒、安定化液体または保護酵素の形態でフェノール系化合物に対するオキシダーゼ活性を示す酵素を含むことを特徴とする、洗液中で布帛を洗濯しおよび/またはすすぐ場合に、染色した布帛から他の布帛への繊維染料の移行を防止するための剤。

【請求項21】オキシダーゼ活性を示す酵素がカテコールオキシダーゼ (EC 1.10.3.1) またはラッカーゼ (EC 1.10.3.2) である請求の範囲第20項に記載の剤。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、洗濯の間に染色した布帛から他の布帛へ染料が移ることを防止するための酵素的な方法、該方法に使

用するための漂白剤および溶液中で染料を漂白する方法に関する。

発明の背景

洗濯方法においておよび洗剤組成物の構成成分としての漂白剤の使用は当該技術で公知である。すなわち、漂白剤は市販の洗剤組成物の主要部分の構成成分として混入されるかまたは売られている。洗剤組成物において混入される重要な通常の漂白剤は洗濯方法の過程で形成される過酸化水素前駆体として作用する化合物である。過ホウ酸塩および過炭酸塩は漂白剤として使用されそしてこの方法で漂白効果を示す化合物の最も重要な例である。これらの漂白剤を用いた漂白の詳細なメカニズムは現時点では知られていないが、しかし一般には洗濯の間に形成される過酸化水素が着色物質 (布のしみに対応) を酸化により非着色物質へ転化しそして着色物質の幾つかの酸化が過ホウ酸塩または過炭酸塩と直接反応するために生じるのであろうということが推測されている。

これらの通常使用される漂白剤の1つの欠点は、着色された布帛が通常洗濯される低温でこれらが特に有効であるとは限らないことである。これらの有効性は過酸の形成をもたらすアクチベーター (たとえば有機酸無水物、エステルまたはイミド) の使用により強化される。

布帛のしみを漂白するために使用することに加えて、このような通常の漂白剤は、洗濯時に布帛から滲み出す着色布帛からの剰余染料が同じ洗濯物中に存在する他の布帛に付着すること (この現象は通常染料移行として知られている) を防止することもまた提案されている。もちろん染料移行の問題は、白色または淡色布帛を染料が洗濯の間に滲出する暗色の布帛と一緒に洗濯する場合に最も重要である。

しかしながら、最近使用される漂白剤は、活性化されていてもいなくても、多分これらが溶解した染料を酸化する速度がむしろゆっくりなので、染料移行を防止することにおいて特に効果があるというわけではないことが見出された。他方、漂白アクチベーターから形成される過酸は布帛の染料に対して活性でありこれにより問題となる布帛の脱色を起こす。

米国特許第4,077,768号には、染料移行防止のために過酸化水素とともに鉄ポルフィン、ヘミンクロリドもしくは鉄フタロシアニンまたはこれらの誘導体を一緒に使用することが記載されている。これは、これらの化合物が漂白方法に対する触媒として作用しこれにより布帛における染料のいかなる脱色をも起こすことなく溶解した染料を酸化 (換言すれば漂白) する速度を向上することを示唆している。しかしながら、これらの触媒は過剰の過酸化水素の存在により破壊され、このことより染料移行の防止を行なうのに必要な量だけの過酸化水素がいずれの時点でも洗濯液に存在するように過酸化水素の放出量を調節することが必要となる。このような漂白剤の調

節された放出は達成するのが困難である。

発明の概略

驚くべきことに、着色物質を含む有機または無機物質の酸化に対し過酸化水素または酸素分子を利用する酵素を洗液へ添加する場合、染色された繊維または洗液の溶液中の着色剤で汚された繊維から滲出する着色物質を漂白しこれにより洗液中で当該着色物質が他の繊維に付着することを防止することができるが見出された。このような酵素はそれぞれ通常ペルオキシダーゼおよびオキシダーゼと言われている。

したがって、本発明は洗液中で布帛と一緒に洗濯および／またはすすぎ場合染色された布帛から他の布帛へ繊維染料が移行するのを防止する方法であって、

- 1) a) 前記布帛を洗濯および／またはすすぎ洗液へペルオキシダーゼ活性を示す酵素を添加し、そして
b) 洗濯および／またはすすぎ過程の最初またはその間に過酸化水素、過酸化水素前駆体または過酸化水素を発生しうる酵素系を添加するか、または
- 2) フェノール系化合物においてオキシダーゼ活性を示す酵素を添加する

ことからなる方法に関するものである。

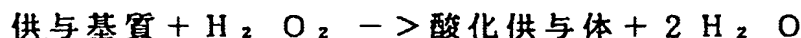
本明細書中、用語“ペルオキシダーゼ活性を示す酵素”とはペルオキシダーゼのものと同じ活性形態を有しそしてこれと同じに使用されるであろう酵素を示すと理解されたい。同様に、用語“オキシダーゼ活性を示す酵素”とはオキシダーゼのものと同様の作用形態を有しそ

して以下のようにしてこれと同じ意味である酵素を示すものと理解されたい。適当なオキシダーゼはたとえばフェノールおよび関連物質のような芳香族化合物に作用するものである。

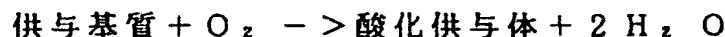
酵素がペルオキシダーゼ活性を有するもの場合は、洗濯および／またはすすぎ過程の最初にまたはその間に酵素に対する基質1種以上が添加される。オキシダーゼの場合には酸素分子が通常十分量で存在する。

様々なアミノおよびフェノール系化合物におけるペルオキシダーゼの作用により色が生じるということは当該技術においてよく認識されている（たとえば、ビー・シー・サウンダーズB.C. Saundersら、Peroxidase、ロンドン、1964、p. 10ff）。この点において、ペルオキシダーゼ（および特定のオキシダーゼ）がまた溶液中の着色物質に作用して染料移行を防止することを示すことは驚くべきことであると考えなければならない。これらの酵素の染料移行防止能力を支配するメカニズムはまだ明らかにされていないが、最近では酵素が作用して過酸化水素または酸素分子を還元しそして洗液中に溶解または分散している着色物質（供与基質）を酸化し、これにより無色物質を生じるかまたは布帛に吸着しない物質を提供するのではないかと考えられている。この反応は以下に示す反応式1（ペルオキシダーゼについて）および以下に示す反応式2（本発明の目的に有用なオキシダーゼ）において示される。

反応式 1 :



反応式 2 :



これまでにペルオキシダーゼが特定染料を脱色することが報告されている（たとえば、ダブリュ・シュライバー（W. Schreiber）, Biochem. Biophys. Res. Commun. 63

（2）, 1975, p. 509-514、ホースラディッシュペルオキシダーゼによる3-ヒドロキシフラビンの分解について記載；エー・ベン・アジズ（A. Ben. Aziz）, Phytochemistry 10, 1971, p. 1445-1452、ペルオキシダーゼを用いたカロテンの漂白について記載；およびビー・ピー・ワッサーマン（B. P. Wasserman）, J. Food Sci. 49, 1984, p. 536-538、ホースラディッシュペルオキシダーゼによるベタラインの脱色について記載）。ベン・アジズらおよびワッサーマンらは、それぞれカロテンおよびベタリンにおけるペルオキシダーゼの漂白活性を食品用着色剤としてこれらの染料を用いた場合の問題として提供しており、この問題は当該食品に抗酸化剤を含有していることにより遭遇するに違いない。すなわち、彼らはこれらの染料のペルオキシダーゼ仲介漂白がそれ自体いずれか

の実際の有用性を有するということを考えていない。

これらの刊行物はそれぞれの染料を溶液中で酵素とインキュベートすることによる試験方法を記載しているが、当該染料はすべて天然起源の純粋な化合物であり、現在の洗剤に通常混入される漂白剤によりただちに漂白される（たとえば、Second World Conference on Detergenst、エー・アール・バルドウィン（A. R. Baldwin）編、American Oil Chemist's Society, 1978, p. 177-180）。

これと反対に、通常使用される繊維染料は、これが洗液中に溶解または分散した場合、大気酸素による酸化に対し一般に耐性があり、また洗剤中に最近使用されておりそして米国特許第4,077,768号に記載のように分散または溶解した染料においてあまりにゆっくり作用するので不十分な染料移行防止剤である漂白剤に対しても多少耐性がある。これらの条件下で、本発明方法で使用される酵素が実際これらの染料を酸化することができるとい

うことは驚くべきことであると考えられるべきである。溶液または分散液中で繊維染料に作用する他の通常使用される漂白剤、たとえばハイポクロライトもまた繊維における染料に攻撃し、その結果脱色する。本発明方法で使用される酵素は染色された布帛自体には何らの明らかな色分解を起こさないという重要な利点を有する。通常使用される繊維染料、合成（たとえばアゾ染料）および天然または天然同一性（これは合成的に作られるがただし構造および特性は天然化合物と同じである物質を意味する）、たとえばインジゴの総合カタログはカラーインデックス (Color Index) 第3版、1～8巻に見られる。

別の見地において、本発明は溶液または分散液中の繊維染料を漂白する方法であって、前記溶液または分散液へ、

- 1) a) ペルオキシダーゼ活性を示す酵素および
b) 過酸化水素、過酸化水素前駆体または過酸化水素を発生しうる酵素系
または
- 2) フェノール系化合物においてペルオキシダーゼ活性を示す酵素
を添加することからなる。

洗濯またはすすぎ過程の間の染料移行を防止することにおける有用性に加えて、溶液中の染料の漂白に対するこれら酵素の力により酵素が廃棄物処理方法の一部を形成する繊維工業からの排水処理に有用になることが予期される。

別の見地において、本発明は布帛と一緒に洗濯および/またはすすぎ場合染色された布帛から別の布帛への繊維染料の移行を防止するための漂白剤であって、

- a) ペルオキシダーゼ活性を示す酵素および
b) 過酸化水素、過酸化水素前駆体、または過酸化水素を発生しうる酵素系
からなる漂白剤に関する。

最後に、本発明は、フェノール系化合物におけるペルオキシダーゼ活性を示す酵素からなる、無粉塵性顆粒、安定化液体または保護された酵素の形態の酵素洗剤添加剤に関する。

この有用性に加えて、漂白剤はまた上述したように繊維工業および多分その他の工業から排水の処理にも使用される。

本発明の詳細な記述

芳香族化合物、特にフェノール類たとえば多価フェノール類に作用する適当なオキシダーゼの例は、カテコールオキシダーゼ (EC 1.10.3.1) またはラッカーゼ (EC 1.10.3.2) である。便宜上、このようなオキシダーゼ、およびペルオキシダーゼは以下のように一まとめにして漂白酵素と名付けられる。

本発明目的に使用される漂白酵素は植物により産生される（たとえば、ホースラディッシュペルオキシダー

ゼ）または微生物たとえば真菌または細菌により産生されそして単離される。好ましい真菌の幾つかには亜門不完全菌亜門 (Deuteromycotina)、綱線菌綱 (Hyphomycetes) たとえばフサリウム (Fusarium)、フミコラ (Humicola)、トリコデルマ (Trichoderma)、ミロテシウム (Myrothecium)、ベルティシウム (Verticillium)、アルスロミセス (Arthromyces)、カルダリオミセス (Caldariomyces)、ウロクラジウム (Ulocladium)、エンベリシア (Embellisia)、クラドスポリウム (Cladosporium) またはドレシュレラ (Dreschlera)、特にフサリウム オキシスポラム (Fusarium oxysporum) (DSM 2672)、フミコラ インソレンス (Humicola insolens)、トリコデルマ レシイ (Trichoderma reesei)、ミロテシウム ベルーカナ (Myrothecium verrucana) (IFO 6113)、ベルティシウム アルボアトラム (Verticillium albo-atrum)、ベルティシウム ダリエ (Verticillium dahliae)、アルトロミセス ラモサス (Arthromyces ramosus) (FERM P-7754)、カルダリオミセス フマゴ (Caldariomyces fumago)、ウロクラジウム チャルタラム (Ulocladium chartarum)、エンベリシア アリオール (Embellisia allior)、ドレシュレラ ハロデス (Dreschlera halodes) に属する菌株を含む。

他の好ましい真菌は、亜門担子菌亜門 (Basidiomycotina)、綱バシジオミセテス (Basidiomycetes)、たとえばコプリナス (Coprinus)、ファネロチャエテ (Phanerochaete)、コリオルス (Coriolus) またはトラメテス (Trametes)、特にコプリナス シネレウス エフ. ミクロスポラス (Coprinus cinereus f. microsporus) (IFO 8371)、コプリナス マクロリザス (Coprinus macrorrhizus)、ファネロチャエテ クリソスポリウム (Phanerochaete chrysosporium) (たとえばNA-12) またはコリオルス ベルシコロール (Coriolus versicolor) (たとえば、PR4 28-A) に属する菌株を含む。

さら好ましい真菌は、亜門接合菌亜門 (Zygomycotina)、綱ミコラセア (Mycoraceae)、たとえばリゾーパス (Rhizopus) またはムコーラ (Mucor)、特にムコーラ ヒエマリス (Mucor hiemalis) に属する菌株を含む。

幾つかの好ましい細菌はアクチノミセタレス (Actinomycetales) 目、たとえばストレプトミセス スフェロイデス (Streptomyces spheroides) (ATCC 23965)、ストレプトミセス テルモビオラセウス (Streptomyces thermoviolaceus) (IFO 12382) またはストレプトベルティシウム ベルティシウム エスエスピイ. ベルティシウム (Streptovorticillum verticillium ssp. verticillium) の菌株を含む。

他の好ましい細菌は、バチルス プミルス (Bacillus pumilus) (ATCC 12905)、バチルス ステアロテ

ルモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)、ロードバクター スファエロイデス (*Rhodobacter sphaeroides*)、ロードモナス パルストリイ (*Rhodomonas palustri*)、ストレプトコッカス ラクティス (*Streptococcus lactis*)、プソイドモナス プロシニア (*Pseudomonas purrocinia*) (ATCC 15958) またはプソイドモナス フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*) (NRRL B-11) を含む。

有用な漂白酵素 (特にペルオキシダーゼ) の他の潜在的供給源はピィ. シィ. サウンダーズ (B. C. Saunders) ら、前掲、p. 41~43に挙げられている。

本発明により使用される酵素の製造方法は当該技術において記載されており、たとえばFEBS Letters 1625, 173 (1), Applied and Environmental Microbiology, 1985年2月、p. 273~278, Applied Microbiol. Biotechnol. 26, 1987年、p. 158~163, Biotechnology Letters 9 (5), 1987年、p. 357~360, Nature 326, 1987年4月2日、FEBS Letters 4270, 209 (2), p. 321、ヨーロッパ特許第179, 486号、ヨーロッパ特許第200, 565号、英国特許第2, 167, 421号、ヨーロッパ特許第171, 074号およびAgric. Biol. Chem. 50 (1), 1986年、p. 247を参照せよ。

特に好ましい漂白酵素は、洗液の一般的pH、すなわちpH6.5~10.5、好ましくは6.5~9.5、そして最も好ましくは7.5~9.5で活性であるものである。このような酵素は、好アルカリ性微生物による関連のある酵素産生についてスクリーニングすることにより単離され、これはたとえばアール. イー. チャイルズ (R. E. Childs) およびダブリュ. ジィ. バルドスレイ (W. G. Bardsley), Biochem. J. 145, 1975, p. 93~103に記載のABTS分析を用いて行なわれる。

他の好ましい漂白酵素は良好な熱安定性ならびに通常使用される洗剤成分たとえば非イオン、陽イオン、または陰イオン界面活性剤、洗剤ビルダー、リン酸塩等に対し良好な安定性を示すものである。

有効な漂白酵素の別な群はハロペルオキシダーゼたとえばクロローおよびプロモペルオキシダーゼである。

さらに漂白酵素は、前記酵素をコードするDNA配列ならびに酵素をコードするDNA配列の発現を許す機能をコードするDNA配列を有する組換え体DNAベクターで形質転換された宿主細胞を酵素の発現を許す条件下で培養基にて培養し培養物から酵素を回収することからなる方法により産生されうるものである。

酵素をコードするDNAフラグメントの単離は、たとえば目的とする酵素を産生する微生物、たとえば上述した微生物の1つのcDNAまたはゲノムライブラリを確立し、そして常法にしたがってたとえば酵素のアミノ酸配列の一部または全部に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドプローブへハイブリッド化するか、適当な酵素活性を発現するクローンを選択するか、または天然酵素に

対する抗体と反応するタンパク質を産生するクローンを選択するかにより陽性クローンについてスクリーニングすることにより行なわれる。

一度選択されると、DNA配列は特定の宿主生物中で酵素が発現するのを許す適当なプロモーター、オペレーターおよびターミネーター配列ならびに当該宿主微生物中でベクターを複製させる複製の開始点を有する適当に複製可能な発現ベクターへ挿入される。

得られた発現ベクターを、次いで適当な宿主細胞たとえば真菌細胞、その好ましい例としてはアスペルギルス (*Aspergillus*) 種、最も好ましくはアスペルギルス オリザエ (*Aspergillus oryzae*) またはアスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) へ形質転換した。真菌細胞は、プロトプラスト形成およびプロトプラストの形質転換と続くそれ自体公知の方法で細胞壁の再形成を行なうことを含む方法により形質転換される。宿主微生物としてのアスペルギルスの使用はヨーロッパ特許第238, 023号 (ノボ ノンダストリイ エー/エス) に記載されており、その内容は参考としてここに編入される。

これに代わり、宿主生物が細菌特にストレプトミセス (*Streptomyces*) およびバチルス (*Bacillus*) の菌株または大腸菌 (*E. coli*) でもよい。細菌性細胞の形質転換は常法によりたとえばティ. マニアティスら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、コールドスプリングハーバー、1982に記載されているように行なわれる。

適当なDNA配列のスクリーニングおよびベクターの構築もまた標準的方法によりたとえばティ. マニアティスら、前掲により行なわれる。

形質転換宿主細胞の培養に使用する培地は、当該宿主細胞を増殖するのに適する通常の培地のいずれでもよい。発現酵素は培養基へ都合良く分泌されそして遠心分離または濾過により培地から細胞を分離し、硫酸アンモニウムのような塩を用いて培地のタンパク質豊富成分を沈でんさせ、続いてたとえばイオン交換クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ等のクロマトグラフィ法を行なうことを含む良く知られた手段によりこれから回収される。

本発明で使用される漂白酵素がペルオキシダーゼである場合、 H_2O_2 は方法の初期またはその間、たとえば0.001~5mM、特に0.01~1mMの量で添加される。コプリナスペルオキシダーゼを用いる場合、0.01~0.25mM H_2O_2 が好ましく、バチルス プミルスペルオキシダーゼでは0.1~1mM H_2O_2 である。

本発明方法で使用される漂白酵素がペルオキシダーゼの場合、過酸化水素形成のための酸素的方法を使用することが望ましい。したがって、本発明方法はさらに洗濯および/またはすすぎ過程の初期またはその間に過酸化水素を発生しうる酵素系 (すなわち、酵素とその基質) を添加することを含む。

過酸化水素発生系のこのようなカテゴリの1つは、

酸素分子および有機または無機基質を過酸化水素と酸化基質のそれぞれへ転化しうる酵素からなる。これらの酵素は過酸化水素をわずかな低レベルで作るだけだが、ペルオキシダーゼの存在が作られた過酸化水素の有効な利用を保証するので本発明方法に非常に有利に使用される。

好ましい過酸化水素発生酵素は、洗剤組成物へ都合良く含まれる安価で容易に入手可能な基質に作用するものである。このような基質の例としてはグルコースでありこれはグルコースオキシダーゼを用いた過酸化水素生産に利用される。他の適当なオキシダーゼは尿酸オキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、アミノオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼおよびコレステロールオキシダーゼである。

驚くべきことに、洗濯および/またはすすぎ過程の初期またはその間に別の酸化性基質（本発明方法で使用される漂白酵素に対し）を添加すると使用される漂白酵素の染料移行防止効果が強化されることが見出された。これは着色物質の漂白または他の変性に関係するこの基質の短命な基または他の酸化部位の形成に起因するものと思われる。このような酸化性基質の例としては、金属イオンたとえば Mn^{++} 、ハライドイオンたとえば塩素または臭素イオン、または有機化合物たとえばフェノールたとえばp-ヒドロキシケイ皮酸または2,4-ジクロロフェノールである。本発明の目的で使用されるフェノール性化合物の他の例は、エム・カトー (M. Kato) およびエス・シミズ (S. Shimizu), *Plant Cell Physiol.* 26 (7), 1985, p. 1291~1301 (特に第1表) またはビィ・シー・サウンダーズら、前掲、p141ffに記載されたものである。添加されるべき酸化性基質の量は約 $1 \mu M \sim 1mM$ の間が適当である。

本発明の方法において、漂白酵素は一般に洗剤組成物の成分として添加される。そういうものとして、これは無粉塵性顆粒、液体特に安定化液体または保護された酵素の形で洗剤組成物中に含まれる。無粉塵性顆粒は、たとえば米国特許第4,106,991号および第4,661,452号（両方ともノボ インダストリィ エー/エス）に記載のように作られ、そして場合により当該技術で公知の方法により被覆される。液体酵素製剤はたとえば確立された方法にしたがってポリオールたとえばプロピレングリコール、糖または糖アルコール、乳酸またはホウ酸を加えることにより安定化される。他の酵素安定剤は当該技術で良く知られている。保護された酵素はヨーロッパ特許第238,216号に記載された方法にしたがって調製される。洗剤組成物は酵素に対する基質1つ以上を含んでもよい。

洗剤組成物はさらに陰イオン、非イオン、陽イオン、両性またはツィッターイオン型からなる界面活性剤ならびにこれら界面活性剤クラスの混合物を含む。陰イオン界面活性剤の代表的例は直線状アルキルベンゼンスルホ

ネート (LAS)、 α -オレフィンスルホネート (AOS)、アルコールエトキシスルフェート (AES) および天然脂肪酸のアルカリ金属塩である。

洗剤組成物はさらに当該技術での公知の他の洗剤成分たとえばビルダー、抗腐蝕剤、金属イオン封鎖剤、抗一よごれ再付着剤、芳香剤、酵素安定剤等を含む。

現在は、本発明において、漂白酵素を洗液11につき酵素0.01~100mgの量で添加することが予期される。

洗剤組成物は都合の良い形態たとえば粉末または液体にて配合される。酵素は上述のように酵素安定剤を含むことにより液体洗剤中で安定化される。液体洗剤はさらに安定化された過酸化水素前駆体を含んでもよい。通常、本発明の洗剤組成物溶液のpHは7~12であり、ある場合には7.0~10.5である。他の洗剤酵素たとえばプロテアーゼ、リパーゼまたはアミラーゼを洗剤組成物中に含んでもよい。

例

染料はアルドリッチ ケミカルズ社 (Aldrich Chemicals) から入手した。ペルオキシカルボン酸対照物は、ダブリュ・イー・パーカー (W. E. Parker)、シィ・リキユーティ (C. Ricciuti)、シィ・エル・オググ (C. L. Ogg) およびディ・スヴェルン (D. Swern)、*J. Am. Chem. Soc.* 77, 4037 (1955) にしたがって合成された。スペクトルをヒューレット パッカード (Hewlett Packard) 8451ダイオード アレイ スペクトロフォトメーターにおいて記録した。サンプルを1分間にわたり波長範囲200~800nmでスキャンした（スペクトルを6秒毎に記録）。CMPは、コプリナス マクロリズス (*Coprinus macrorrhizus*) から由来するペルオキシダーゼに対する略号として以下に使用する（ケミカル ダイナミクス (Chemical Dynamics) 社製）。 H_2O_2 は過酸化水素と同じ意味で使用される。2,4-DCPおよびPCAは2,4-ジクロロフェノールおよびp-クマリン酸の略号として使用される。

例 1

溶液中のコンゴレッドの漂白

リン酸緩衝液pH7 (0.1M) 中にコンゴレッド (0.058mM、42mg/l) (染料含有率93%、486nmでの初期吸光度2.0) が溶解している液へ、2mM H_2O_2 、1mMペルオキシオクタン酸または2.5mg/l CMP+0.25mM H_2O_2 のいずれかを漂白剤として加えた。実験は、1mlを含む1cm水晶セル中25℃にて実施された。以下に記載のように、ペルオキシダーゼ系のみが何らかの漂白効果を示した（1分間における486nmの吸光度における観察された変化としてモニター）。

漂白システム	1分間における吸光度差 (Δ)
2mM H_2O_2	0.00
1mMペルオキシオクタン酸	0.00
2.5mg/1 CMP+0.25mM H_2O_2 例 2	0.18

フェノール系化合物による漂白促進

実験は例1にしたがって実施したが、ただしペルオキシダーゼおよび H_2O_2 とともに追加の基質として様々なフェノール性化合物を添加する促進効果を実験した。2,4-DCPおよびPCAを5 μ Mだけのレベルで添加した（両方の場合とも0.82mg/()）。

漂白システム	1分間における吸光度差 (Δ)
2.5mg/1 CMP+0.25mM H_2O_2	0.18
2.5mg/1 CMP+0.25mM H_2O_2 +5 μ M 2,4-DCP	0.74
2.5mg/1 CMP+0.25mM H_2O_2 +5 μ M PCA	0.28

例 3

溶液中の酸性ブルー45の漂白

実験を例1にしたがって実施したがただし酸性ブルー45 (0.058mM, 68mg/()) (染料含有率約40%)、594nmでの初期吸光度1.0)を用いた。漂白は594nmでの吸光度における変化として測定された。

漂白システム	1分間における吸光度差 (Δ)
2mM H_2O_2	0.00
1mMペルオキシオクタン酸	0.00
2.5mg/1 CMP+0.25mM H_2O_2 例 4	0.42

フェノール系化合物による漂白促進

実験は例2に記載のように実施されたが例3に記載のように酸性ブルー45を用いた。

漂白システム	1分間の吸光度差(Δ)
2.5mg/1 CMP+0.25mM H_2O_2	0.42
2.5mg/1 CMP+0.25mM H_2O_2 +5 μ M 2,4-DCP	0.69
2.5mg/1 CMP+0.25mM H_2O_2 +5 μ M PCA 例 5	0.98

例1および3にしたがって、調製したコンゴレッドおよび酸性ブルー45の溶液をラッカーゼ (100mg/())、粗製酵素製剤、ミコリオフトラ テルモフィル (Myceliophthora thermophila) 由来、特製品SP315としてノボ ノルディスクから入手。これ以上の情報は必要に応じて入手される) で処理された。酵素を添加しない溶液と比較した吸光度の差を16時間のインキュベーション時間後に測定した。

漂白剤	16時間後の吸光度における差異 コンゴレット (486nm)	酸性ブルー45 (594nm)
0.1g/1ラッカーゼ 例 6	0.29	0.09

繊維への染料吸着

上記溶液実験において見られる効果がこのような溶液中に存在する繊維において影響を及ぼすことを示すために、きれいな綿のスワッチをモデルの繊維染料の溶液中に浸漬して実験を行なった。

このような実験の1つにおいて、きれいなスワッチを50mMリン酸塩緩衝液 (pH7.0, 25°C) 中の染料酸性ブルー45の0.058mMおよび0.012mM溶液それぞれに浸漬し、60分間攪拌した。リン酸塩緩衝液は、1.6mM Ca^{2+} に相当する硬度の水から新しく調製した。スワッチ荷重は約11g綿布/()であった。

その後スワッチをタップ水中ですすぎ、きれいなタオル上で一晩暗くして風乾した。600nm (青色物質に対する吸収領域) での規約反射率は、データカラー エルレフオメーター (Datacolor Elrephometer) 2000において測定された。

上記指示にしたがって3つの処置の結果は次のようである：

	600nmにおける規約反射率(%) 0.058mM酸性ブルー45溶液から回収したスワッチ	0.012mM酸性ブルー45溶液から回収したスワッチ
1. 対照物(緩衝液のみ)	60	80
2. 0.2mM H_2O_2	58	79
3. 2におけるような H_2O_2 + 20mg/1CMP	74	90

ここで規約反射率の値が高くなると青色が薄くなる。したがって、きれいなスワッチにおける染料付着はペルオキシダーゼが存在する溶液中でかなり低くなる。

例 7

繊維への染料吸着

別の実験において、例6の手法をすべて詳細に繰り返すが、ただし溶液中の染料はコンゴレッド (同じmMレベル) であった。ここで、得られたスワッチの視覚検査は明確にペルオキシダーゼの効果を示した：処理1および2では区別がつかない程そして深紅色に着色されたスワッチが得られたが、一方処理3からのスワッチにおいてははかすかに黄色が見られるだけであった。

例 8

繊維への染料吸着

本例において、特定の種類のスワッチを染料吸着効果を示すために加えた。各スワッチは繊維ストリップ6本からなり、各々1.5cm×5cmで、一緒に散布された。6本の繊維の種類は、トリアセテート、漂白された綿、ナイロ

ン、ポリエステル、オーロンおよびビスコースレーヨンであった。

モデル洗液は、界面活性剤として添加された0.6g/()線状アルキルベンゼンスルホネートを有し例6のように調製されたリン酸塩緩衝液であった。2本の7cm×7cmのきれいなスワッチと上記複数のスワッチの1つ（これもきれい）を、2つのテルグーオートメーター（Terg-O-Tometer）ピーカーの各々において、0.012mMのレベルまで添加されたコンゴレッドを有する洗液11中に浸漬した。ピーカー1において、漂白システムは2mMレベルのH₂O₂からなり、ピーカー2において、さらにCMP 20mgが添加された。60回転/分で40℃にて30分洗浄し、その後スワッチをタップ水ですすぎそして上記（例6）のように乾燥した。ハンター色差計による読取りが以下のように複数のスワッチについて得られた：

	ハンター色差計読取り	
	ピーカー1 (H ₂ O ₂ だけ)	ピーカー2 (H ₂ O ₂ +CMP)
トリアセート	7.5	2.0
綿	69.9	35.0
ナイロン	57.2	23.4
ポリエステル	16.0	5.0
オーロン	27.4	9.8
ビスコース	69.7	30.7

（ここで値0はきれいなスワッチから色の変化がないことを示し、数が増えと色が濃くなる視覚的印象に相当する。）

したがって例6からの結果がここで研究したすべての繊維の種類についても有効である。

例 9

繊維から繊維への染料移行

アゾ繊維染料に対するモデル染料としてのコンゴレッドで染色されたスワッチを、脱ミネラル化水中のコンゴレッドおよび硫酸ナトリウム浴中にきれいな綿スワッチを浸漬しそして90℃まで次第に加熱しさらに硫酸ナトリウムを添加することで終了しそして90℃の一定温度の期間にわたってこれをここに維持することにより調製した。染色後、スワッチを冷タップ水ですすぎ、そしてガーゼの層の間で一晩乾燥した。

本例において、例8に記載のように同じ一般的条件下で3つのテルグーオートメーター ピーカー中で洗濯を行なった。ピーカーの内容物は次のようであった：

ピーカー1: LASを有するリン酸塩緩衝液のみ（例8に示すように）

ピーカー2: 緩衝液+LAS+2mM H₂O₂

ピーカー3: 20mg/() CMPを添加された2

各ピーカーにおいて2つのコンゴレッドスワッチ7cm×7cmを導入し、そして1つがきれいな複数スワッチ（例8参照）であった。例8のように洗濯および乾燥

後、複数スワッチのハンター読取りは以下のようであった：

	ピーカー1	ピーカー2	ピーカー3
トリアセート	3.4	3.4	2.8
綿	45.7	45.3	36.6
ナイロン	41.6	40.9	35.6
ポリエステル	7.9	7.4	6.7
オーロン	14.7	15.0	11.2
ビスコース	45.1	44.6	36.3

すなわち、ピーカー1におけるスワッチには過酸化水素単独では治らない実質的染料移行が生じるが、ペルオキシダーゼ処理によりかなり減少する。

3つのピーカーからの赤色スワッチは実質的に同一の読取り値を有し、これはペルオキシダーゼ処理が他の処理よりも一層染色を変化させないことを示す。

例 10

繊維への染料吸着

さらに実際の洗濯環境下でペルオキシダーゼ効果を研究する目的で、以下のように粉末洗剤を構成した：

成分	有効物質 (w/w%)
炭酸ナトリウム	22
二リン酸ナトリウム	17
ケイ酸ナトリウム	7
三リン酸ナトリウム	5
過ホウ酸ナトリウム一水和物	4
ノナイルイオキシベンゼンスルホン酸ナトリウム5	

直線状アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム9
アルキル硫酸ナトリウム 4

様々な少量成分：アルコールエトキシレート、ジエチレントリアミンペンタアセート、ポリアクリレート、ポリエチレングリコール、プロテアーゼ、蛍光増白剤
硫酸ナトリウムおよびその他 残り

この洗剤を1.6mM Ca²⁺に相当する硬度の水に2g/()のレベルで使用してpH8.5に調節された洗液を作った。この洗液において、コンゴレッドを0.012mMのレベルまで溶かした。ピーカー1は対照物（洗剤+コンゴレッド）である；ピーカー2において、CMPは20mg/()のレベルまで添加された。両方のピーカーにおいて、2つのきれいな綿スワッチと1つのきれいな複数スワッチを例8のように加えた。他のすべての条件は例8のようにであり、洗濯後の複数スワッチに対するハンター値は次のようであった：

	ピーカー1	ピーカー2
トリアセート	4.0	1.1
綿	62.5	2.3

	ビーカー 1	ビーカー 2
ナイロン	48.0	1.1
ポリエステル	4.0	0.4
オーロン	18.4	1.2
ビスコート	66.3	1.3

ここでもまた、ペルオキシダーゼはスワッチに付着した色素の量を明らかに減少—ここでもほとんど排除—する。

例 11

繊維から繊維への染料移行

本例において、例10からの洗浄溶液をテルグーオートメーター試験に使用し、ここで上記した（例9）コンゴレッド—染色スワッチの2つを2つのビーカーの各々において1つのきれいな複数スワッチと一緒に洗濯した。ビーカー1はちょうど洗剤溶液11を含み、ビーカー2はさらにCMP 20mg/()を含有した。残りの条件は例8のようであった。上述のように洗液から回収し、すすぎそして乾燥後、スワッチは次のハンター色差データを示した：

	ビーカー 1	ビーカー 2
トリアセート	2.3	1.1
綿	47.0	13.1
ナイロン	36.0	11.3
ポリエステル	2.1	1.1
オーロン	6.5	2.7
ビスコート	48.7	10.6

染料のかなりの移行がビーカー1にて観察され、これは洗液へペルオキシダーゼを添加することにより著しく低下した。

再び、染色されたスワッチもまたチェックされ、2つの処理の間に何らの色差も見られなかった。

例 12

溶液における色素の漂白

ペルオキシダーゼ活性：本例において、ペルオキシダーゼ活性を以下のように測定する。次のものを、30℃に温度調節した水晶キューベット中で混合する：

200 μ l 1mM 4—アミノアンチピリン（シグマNo. A—4382、0.2mg/ml）

200 μ l N—エチル—N—スルホブチル—m—トリイジン—Na（ESBT、5.86mg/ml）

200 μ l 0.5Mリン酸塩緩衝液、pH7.0

200 μ l 酵素サンプル、0.02—0.10NOPA/mlまで希釈

20 μ l 10mM過酸化水素を加え、550nmでの吸光度を1分間追跡する。活性（NOPA単位）を、希釈により増加したH₂O₂で添加後最初の1分間における吸光度の増加として計算する。酵素サンプルは吸光度/分における増加が0.02—0.10の限度内になるように希釈されるべきである。パチルス プミルスからのペルオキシダーゼ産生：

培地を次のように調製した（成分g/()）：

	TY* 3
トリブティカーゼ、BBL g/()	60
酵母抽出物、ディフコ g/()	15
FeSO ₄ *7H ₂ O g/()	0.025
MnSO ₄ *4H ₂ O g/()	0.0026
MgSO ₄ *7H ₂ O g/()	0.045
pH	7.3 (KOHで調節)

培地を121℃で45分間オートクレーブした。

	寒天 3
ペプトン バクト g/()	6
ペプティカーゼ g/()	4
酵母抽出物、ディフコ g/()	3
肉抽出物g/()	1.5
グルコース	1
pH	7.3
寒天（メルク社製）	20（最後に添加）

寒天を121℃で45分間オートクレーブした。

接種寒天：10個の寒天3傾斜面にパチルス プミルスの凍結乾燥したペルオキシダーゼ産生菌株を接種し、30℃で24時間にインキュベートした。

接種培地：100ml TY* 3培地を含む2つの500ml振とうフラスコに1つの寒天3傾斜面を接種し、30℃および250rpmで24時間インキュベートした。

ペルオキシダーゼ産生：100ml TY* 3を含む50振とうフラスコを上述の接種材料2mlで各々接種した。次いで40%（w/w）滅菌グルコース水溶液2.5mlを各々の振とうフラスコへ加えた。振とうフラスコを30℃で48時間インキュベートし、次いで採取した。最終的ペルオキシダーゼ活性は1NOPA/mlであった。

3250ml培養プロスをサイズ スーブラ（Seitz Supra a）100フィルタープレート次いでスーブラ（Supra）50プレートに通して濾過して1.29NOPA/mlの活性を有する透明な濾液を得た。

溶液中の染料の漂白：パチルス プミルス（BPP）からの上記透明濾液を試験した。試験した色素はダイレクトブルー1（C. I. #24410、キーストンアニリン社（Keystone aniline）製品）、酸性レッド151（C. I. #26900、サンドーズ社製品）、プロシオンブルー—H ERD（ICI社製品）およびプロシオンブルー—EXL（ICI社製）であった。

反応溶液は室温にて以下に示すpHにて50mMリン酸ナトリウム、0.3NOPA/mlペルオキシダーゼ、最大吸収（可視範囲）0.025—0.035に相当する色素（以下に示す）、および0.25mM H₂O₂を含むように調製された。H₂O₂添加（最後に）後、スペクトルスキュンを12分間にわたって1分毎に行なった。以下に、最大吸収の成長における吸光度の変化を挙げる。

色素	pH	吸光度の変化 直後/12分後	波長
酸性レッド151	7.0	0.030/0.032	513nm
	9.0	0.033/0.033	513-
	10.5	0.027/0.030	513-
ダイレクトブルー1	7.0	0.024/0.025	597nm
	9.0	0.022/0.026	597-
	10.5	0.009/0.023	597-
プロシオンブルーH ERD	7.0	0.022/0.021	617nm
	9.0	0.009/0.022	617-
	10.5	0.001/0.010	617-
プロシオンブルーH EXL	9.0	0.021/0.026	626nm
	10.5	0.016/0.025	626-
	吸光度変化の2つの値が近似している場合、漂白は実		

際瞬間に行なわれる。一般に、全可視範囲にわたる漂白は最大吸収での上記傾向にしたがう。

すべての場合、酵素を有しない0.25mM H₂O₂の使用は染料を変化させない。

フロントページの続き

(72)発明者: ダンフス, トゥーレ
デンマーク国, デーコー—2100 コペン
ハーゲン エー, リブヤエゲルガデ
43, エステー, テーペー

(72)発明者: キルク, オレ
デンマーク国, デーコー—2200 コペン
ハーゲン エン, ステファンガテ 38,
3/テーペー

(72)発明者: ペデルセン, ギッテ
デンマーク国, デーコー—1910, フレデ
リクスベルグ セー, ダナスバイ 6,
3. テーホー

(72)発明者: ベネガス, マニユエル ガルシア
アメリカ合衆国, オハイオ 45231, シ
ンシナティ, レイクショアー ドライブ
901

(56)参考文献 特開 昭61-92569 (J P, A)
特開 昭64-60693 (J P, A)
特開 昭58-17200 (J P, A)
特表 平3-505100 (J P, A)

(58)調査した分野(Int. Cl. ⁶, D B名)
C11D 3/386
C11D 3/395